

Aus dem Institut für Anatomie

(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Merker)
der Freien Universität Berlin

Morphometrische Flächenanalyse der intrauterinen
Entwicklung von fünf Knochen des Rattenschädels
nach einmaliger Behandlung mit niedrigen Dosie-
rungen von Cyclophosphamid und Actinomycin D

D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Zahnarzt Dieter Erbse
aus Berlin

1977

Aus dem Institut für Anatomie

(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Merker)
der Freien Universität Berlin

Morphometrische Flächenanalyse der intrauterinen
Entwicklung von fünf Knochen des Rattenschädels
nach einmaliger Behandlung mit niedrigen Dosie-
rungen von Cyclophosphamid und Actinomycin D

D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Dieter Erbse

aus Berlin

1. Referent: Professor Dr. med. Milan Pospisil
2. Referent: Professor Dr. med. Franz von Bruchhausen

Tag der Promotion: 23. 5. 1977



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

G l i e d e r u n g

- I. Molekularbiologische Wirkung und
teratologische Effekte der Cytostatica
Cyclophosphamid und Actinomycin D
- II. Material und Methode
- III. Ergebnisse der Flächenmessungen
- IV. Diskussion der Ergebnisse
- V. Zusammenfassung
- VI. Literatur
- Anhang: Lebenslauf



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. MOLEKULARBIOLOGISCHE WIRKUNG UND TERATOLOGISCHE EFFEKTE DER CYTOSTATIKA CYCLOPHOSPHAMID UND ACTINOMYCIN D

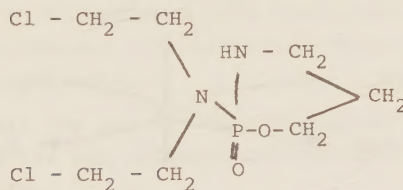
Zur pharmakologischen Gruppe der Cytostatica zählen chemisch sehr verschiedenartige Substanzen: das Enzym L-Asparaginase, die Vitaminantagonisten Methotexat und Aminopterin, bestimmte Platinkomplexe, chemisch veränderte Bausteine von Nukleinsäuren (z. B. Merkaptopurin, Bromdesoxyuridin), Proteinen (Azaserin) oder Kohlenhydraten, synthetische chemische Verbindungen oder Naturstoffe wie bestimmte Antibiotika (NEUBERT 1968). All diesen Substanzen gemeinsam ist eine Interferenz mit den Prozessen der Zellteilung, sei es, daß der genetische Apparat direkt angegriffen wird, die Verteilung der DNS auf die Tochterzellen gestört wird, die genetische Information nicht mehr oder verändert realisiert wird oder daß wichtige Bausteine für die Ausbildung neuer Zellstrukturen nur in ungenügender Menge oder veränderter Zusammensetzung bereitgestellt werden. All diese möglichen Effekte führen zu einer vollständigen oder (meist) partiellen, dauernden oder (meist) temporären, irreversiblen oder (meist) reversiblen Hemmung des Wachstums, d. h. in diesem Fall der Zellteilung (Proliferation). Die therapeutische Anwendung bezieht sich daher auf Prozesse, die durch übermäßige oder unkontrollierte Zellteilungen charakterisiert sind, d. h. sie werden als Immunsuppressiva oder Krebstherapeutika genutzt. Ihre Wirkungen bedingen ihre Nebenwirkungen - im erwachsenen Organismus werden alle reparativen (Wundheilung) und regenerativen Prozesse (Haut, Schleimhäute, Nierenepithelien), verschiedene Immunprozesse und besonders die Blutzellbildung gestört. Bei Einwirkung auf den sich intrauterin entwickelnden Organismus sind Absterben, Wachstumsreduktionen oder Mißbildungen die Regel (z. B. MURPHY 1959, v. KREYBIG 1975, Kontraindikationseintrag Gravidität der ROTEN

LISTE). Die praktische klinische Bedeutung dieser Substanzen als Teratogene ist gering, vereinzelte Mißbildungen, die in Zusammenhang mit einer unbeabsichtigten Therapie während der Frühschwangerschaft angeführt wurden (z. B. GREENBERG et al. 1964, KNÖRR et al. 1969, TOLEDO et al. 1971) sind als individuelle Unglücksfälle einzuschätzen. Für die experimentelle Teratologie haben viele dieser Substanzen jedoch Bedeutung als Modellsubstanzen erhalten.

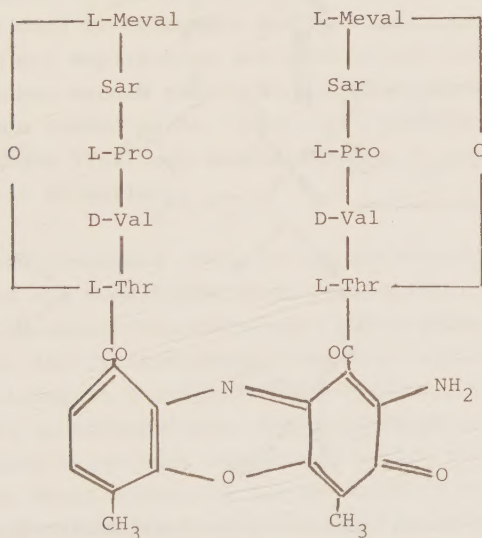
Das wohl bestdokumentierte gegenwärtige Cytostaticum ist das Cyclophosphamid (Abb. 1), über das laut einer Referatreihe der Hersteller (ENDOXAN^R-Sammelreferat) bis heute über 3000 wissenschaftliche oder klinische Mitteilungen erschienen sind. Die Substanz und einige nahe verwandte Verbindungen (DRINGS et al. 1970) werden bevorzugt als Tumortheraeutika eingesetzt. Cyclophosphamid wird im Körper zunächst aktiviert (DRUCKEREY et al. 1963), eines oder mehrere seiner Stoffwechselprodukte (Abb. 2) wirken dann als alkylierende Substanzen, d. h. sie übertragen Alkylgruppen auf körpereigene Verbindungen, z. B. Vorstufen der Nukleinsäuren oder diese selbst und stören oder hemmen dadurch die Zellteilung (z. B. CRATHORN und ROBERTS 1966). Trotz der umfangreichen Untersuchungen gerade über alkylierende Verbindungen, speziell über das Cyclophosphamid, fällt jedoch sofort auf, daß eigentlich sehr wenig Genaues bekannt ist. Cyclophosphamid z. B. könnte nicht in Form seiner Metaboliten als alkylierende Substanz, sondern als sein stark cytotoxisches metabolisches Endprodukt Acrolein (quasi in statu nascendi) zur cytostatischen Wirkung gelangen (ALARCON und MEIENHOFER 1971). Auch über den primären molekularbiologischen Wirkungsort gehen die Ansichten weit auseinander, es ist denkbar, daß gleichzeitig sehr verschiedene Prozesse beeinflusst werden. So haben bis jetzt die umfangreichen biochemischen und damit verbundene cytologische Unter-

Abbildung 1: Struktur der verwendeten Cytostatica

Cyclophosphamid (Endoxan^R ; 2-Bis- (2-chloräthyl)-
amino -tetrahydro-2H-1,3,2-oxazaphosphorin-2-oxid)

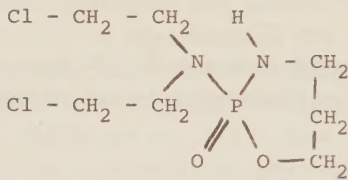


Actinomycin D

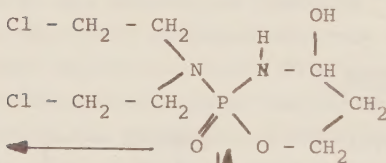


(L-Meal: N-Methyl-L-valin; Sar: Sarcosin; L-Pro:
L-Prolin; D-Val: D-Valin; L-Thr: L-Threonin)

Abbildung 2:

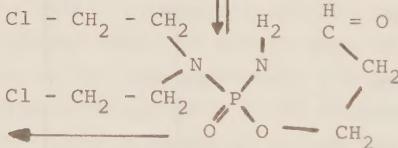


Cyclophosphamid



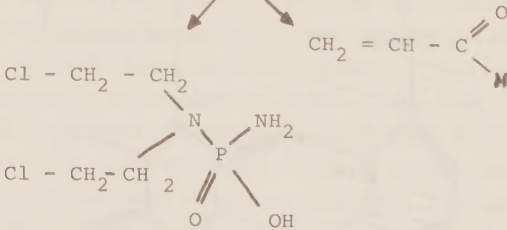
4-Hydroxy-
Cyclophosphamid
cytostatisch

"Ketocyclo-
phosphamid"



"Aldophosphamid"
cytostatisch

"Carboxy-
phosphamid"
gering cyto-
statisch



Acrolein
stark cytostatisch

N.N.-Bis-(2-chloräthyl)-phosphorsäurediamid
cytostatisch

Cyclophosphamid-Abbau (Hauptwege)
(aus VOELCKER et al. 1974)

suchungen (z. B. ENGELS 1970, ENGELS et al. 1968, KÖHLER und MERKER 1973, MERKER et al. 1966, NEUBERT et al. 1970, SCHMID und BAUCHINGER 1968, WHEELER und ALEXANDER 1969) nur denkbare Möglichkeiten aufgezeigt, nach denen Cyclophosphamid direkt wirken kann oder welcher Art seine abgeleiteten Effekte sein können; speziell im Zusammenhang mit teratologischen Fragestellungen können alle bisherigen Untersuchungen nur Denkansätze liefern.

Ähnlich wie für das Cyclophosphamid sieht auch die Situation für das cytostatische Antibiotikum Actinomycin D (Abb. 1) aus.

Actinomycin D soll nach GOLDBERG und REICH (1964) mit seinem Aminophoren-Anteil (Ringstruktur der Abb. 1) sich an bestimmte Basen der Doppelstrang-DNS anlagern und dann zu Störungen der Matrizenfunktion der DNS (1) und der Replikation der Chromosomen und Zellen führen, daneben werden jedoch auch Einwirkungen auf Polyribosomen (SARMA et al. 1969), ein veränderter RNS-Abbau (HARRIS 1964) und andere Effekte am genetischen Apparat diskutiert.

Cyclophosphamid (Tab. 1) und Actinomycin D (Tab. 2) sind als Modellsubstanzen Gegenstand intensiver teratologischer Untersuchungen. Generell kann gesagt werden, daß Cyclophosphamid stärker teratogen und daß Actinomycin D stärker embryotoxisch wirkt. Im Gegensatz zu biochemischen Untersuchungen an Zell- und Gewebekulturen oder Einzellern stellt jedoch die embryonale Entwicklung ein bis heute nicht biochemisch faßbares System dar, weil es gegen den mütterlichen

(1) CONKLIN et al. 1970; LORCH und JEON 1969, SCHLUDERBERG et al. 1971; STERN und FRIEDMAN 1970.

Tabelle 1: Literaturübersicht über einige teratologische Untersuchungen mit Cyclophosphamid (und -derivaten)

Versuchstier:	Autoren:
Ratte	ASISI (1976) CHAUBE et al. (1967) ENGELS (1970), ENGELS et al. (1968) HACKENBERGER und v. KREYBIG (1965) KEUTEL (1975) KLOPPENBURG (1972) KOCHS (1972) KÖHLER und MERKER (1973) v. KREYBIG (1965), v. KREYBIG und SCHMIDT (1967) MERKER (1970), MERKER et al. (1968) SCHMIDT (1967) SIEGERT (1976) SIEGMUND (1977) SINGH (1971) SINGH und SANYAL (1972, 1973, 1974 a, 1974 b) SINGH et al. (1971 a, 1971 b)
Maus	BINS et al. (1973; Ifostamid) GEBHARDT (1970) GIBSON und BECKER (1968 a, 1968 b, 1971) GIBSON und SHORT (1971) HACKENBERGER und v. KREYBIG (1965) HEINECKE und KLAUS (1973) SHOJI und OHZU (1965) SHORT und GIBSON (1974)

Versuchstier:	Autoren:
Kaninchen	FRITZ und HESS (1971) GERLINGER (1964) GERLINGER et al. (1973) GOTTSCHESKI und ZIMMERMANN (1963)
Huhn	SINGH und GUPTA (1972) SINGH et al. (1974)
Mensch	GREENBERG et al. (1964) KNÖRR et al. (1969) TOLEDO et al. (1971)

Tabelle 2: Literaturübersicht über einige teratologische Untersuchungen mit Actinomycin D

Versuchstier:	Autor:
Ratte	CARPENT und DESCLIN (1967) JORDAN und WILSON (1970) KLOPPENBURG (1972) KÖHLER und MERKER (1972) POZHIDAYEV (1969) SIEGERT (1976) TUCHMANN-DUPLESSIS und MERCIER- PAROT (1958, 1959 a, 1959 b, 1960 a, 1960 b) WILSON (1966)
Maus	GOLBUS et al. (1973) SKALKO und MORSE (1969) TASKA und HILLMANN (1970)
sy. Goldhamster	ELIS und DIPALOC (1970)
Huhn	KLEIN und PIERRO (1963) PASTAN und FRIEDMAN (1968) PIERRO (1961 a, 1961 b) WOLKOWSKI (1970)
Amphibien	BRACHET et al. (1964) TIEDEMANN et al. (1967)

Organismus nicht physiologisch abgegrenzt ist und weil es vor allem einen räumlich wie funktionell differenzierten und trotzdem integrierten Komplex von Untereinheiten darstellt, der sich mit der Zeit schnell und verschiedenartig verändert. Der Einfluß der Differenzierung geht am einfachsten z. B. aus der unterschiedlichen Intensität von Aufnahme und Abbau markierten Actinomycins durch verschiedene Zellarten hervor (HAMANN et al. 1968), in den sich differenzierenden Zellarten des Embryos wird aber durch Actinomycin D (und Cyclophosphamid) besonders die Differenzierung selbst verändert.

Diese Überlegungen sollen deutlich machen, daß zu grundlegenden teratologischen Experimenten, wie etwa dem Aufspüren von Dosis-Wirkungsbeziehungen, aber auch dem Untersuchen von kombinierten Behandlungen das klassische und in gesetzliche Vorschriften eingegangene teratologische Experiment heutigen wissenschaftlichen Ansprüchen nicht mehr genügen kann. In diesen Experimenten wird festgestellt, welche Mißbildungen in welcher Häufigkeit bei bestimmten Versuchstieren zu einer bestimmten Zeit der embryonalen Entwicklung durch eine bestimmte Dosis einer Substanz induziert werden können - die Befunde werden durch Deskription gewonnen. Da jedes embryonale Gewebe jedoch separat und spezifisch reagieren kann und geringe Veränderungen der Deskription entgehen, müssen moderne quantitative Verfahren entwickelt werden, die gezielte Untersuchungen im Embryo bzw. Feten erlauben. Ein solches Verfahren stellt die Morphometrie des fetalen Skelletes dar, durch die auch sehr geringe Veränderungen der Ossifizierung als Antwort auf einen teratogenen (oder embryotoxischen) Schaden exakt registriert werden können. Ziel dieser Arbeit war es, mittels automatischer elektronischer Ausmessung von Teilen des fetalen Rattenschädels die Wirkungen sehr

geringer Dosierungen Cyclophosphamid und Actinomycin D sowie einer Kombination beider Substanzen nach einmaliger Applikation in der Organogenese zu untersuchen und quantitativ zu beschreiben.

II. MATERIAL UND METHODEN

Die Tierversuche wurden mitschwangeren Wistarratten (STAMM SW 69) aus dem Tierzuchtmaterial des Instituts für Pharmakologie, Abt. Embryonalpharmakologie (Prof. NEUBERT), der Freien Universität Berlin durchgeführt. Die Tiere erhielten während der Versuche ad libitum Altromin-R-Futterpellets und Leitungswasser und wurden bei 25°C Tierraumtemperatur und 50-60 % Luftfeuchte gehalten.

Zur möglichst exakten Ermittlung des Zeitpunktes der Konzeption wurden die Tiere an einen veränderten Circadianrhythmus durch Verschiebung der Lichtperiode auf 12 Uhr mittags bis 4 Uhr morgens adaptiert. Zur Paarung wurde jeweils morgens zwischen 8 und 10 Uhr zu je drei Weibchen ein Männchen gesetzt; nach der zweistündigen Verpaarungszeit wurden die Vaginalabstriche auf die Anwesenheit von Spermien untersucht - nach der Erfahrung bedeutet ein positiver Spermienachweis zu durchschnittlich 80 % die Entwicklung einer Trächtigkeit.

Dieser Tag des positiven Spermienachweises wird als Tag (d) Null post Conceptionem (p.c.) bezeichnet.

Die Applikation der beiden Testsubstanzen erfolgte ausschließlich am d 12 p.c. Cyclophosphamid (Endoxan^R, Asta, Bruchwede) wurde gegen 10 Uhr i.p., Actinomycin D (Merk, Sharp und Dohme) s.c. in physiologischer NaCl-Lösung appliziert.

Die Versuchsgruppen wurden wie folgt eingeteilt und bezeichnet:

- K - Kontrolltiere, aliquote Mengen physiologische Kochsalzlösung (i.p.).
- C5 - 5 mg Cyclophosphamid/kg KG, d 12 p.c. i.p.
- C6 - 6 mg Cyclophosphamid/kg KG, d 12 p.c. i.p.
- A 100 - 100 ug Actinomycin D/kg KG, d 12 p.c.
- A 150 - 150 ug Actinomycin D/kg KG, d 12 p.c.
- C4-A100 - 4 mg Cyclophosphamid/kg KG i.p.
+ 100 ug Actinomycin D/kg KG d 12 p.c.

Die Entnahme der Feten erfolgte am 21. Entwicklungstag per sectionem. Die Feten wurden sofort in 10 %ige Formalinlösung übertragen und 14 Tage in dieser Lösung bei Zimmertemperatur fixiert. Danach wurden sämtliche Bauch- und Brusteingeweide, Augen, Haut und subkutanes Fettgewebe abpräpariert. Der Restfetus wurde dann eine Stunde in destilliertem Wasser gewaschen und für 12 Stunden in Aceton, das nach den ersten 20 Minuten einmal gewechselt wurde, aufbewahrt.

Die Aufhellung des Restfeten und Anfärbung der ossifizierten Skelettelemente erfolgte in Anlehnung an JENSCH und BRENT (1966). Hierzu wurden die Präparate in 10 %iger KOH, die 6 mg Alizarinrot S pro Liter enthielt, für sechs bis acht Tage aufbewahrt - jeweils nach Braunfärbung der violetten Farblösung wurde die Flüssigkeit erneuert. An den letzten beiden Tagen wurde die 10 %ige durch eine 1 %ige KOH ersetzt. Die aufgehellten und angefärbten Präparate kamen abschließend für 12 Stunden in ein Gemisch aus Benzylalkohol - Äthanol - Glycerin (1:2:2) und wurden dann in Glycerin aufbewahrt.

Zur Messung der in diesem Versuch ausgewerteten Skelettelemente des Schädels wurde der Kopf abpräpariert und wurden aus dem Schädel folgende Knochen vorsichtig freipräpariert (kleines Skalpell und Präpariernadel) und sofort auf Plastikobjektträger in stets gleicher Anordnung aufgetragen in Eukitt^R eingebettet:

Os interparietale

Ossa nasalia

Praemaxillae

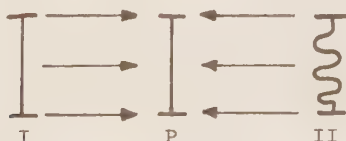
Mandibulae

Ossa parietalia

Diese Präparate wurden photographiert und exakt 10fach vergrößert (Abb. 3 und 4). Die optische Ausmessung der Flächenprojektionen erfolgte mittels Quantimet 720 (Einzelheiten zum Verfahren s. SCHUMACHER und NOACK 1977) analog zu SIEGMUND (1977), wobei die Flächenbestimmung der photographischen Projektionen durch ein mäanderartiges Abfahren der Flächen durch einen Meßstrahl erfolgt, der auf die Differenz von Grauwerten (schwarz = Knochenfläche, weiß = Papierfläche) reagiert und die Zahl der Bildpunkte (84/cm-Strecke bzw. $70,56/\text{mm}^2$) als Flächenmaß ausdrückt. Die Umrechnung in die reale Knochenfläche erfolgt bei 10facher photographischer Vergrößerung nach der Formel:

$$\text{Fläche (mm}^2\text{)} = \frac{\text{Bildpunktzahl}}{10 \times 70,56}$$

Ein systembedingter Nachteil dieses Verfahrens (und aller denkbarer derartiger Verfahren überhaupt) ist die Messung von Knochenflächen (bzw. -längen) als Knochenprojektionen.



Hierbei können sehr stark gewellte Knochenflächen (II), gleiche Projektionsflächen (P) ergeben, wie sehr plane Knochen (I). Diese nicht behebbare Einschränkung gestattet nur die Verwendung bestimmter Elemente, die zudem noch durch ihre Präparierbar-

keit begrenzt ist.

Die registrierten Bildpunktzahlen der einzelnen Knochenelemente in den Versuchsreihen wurden wie üblich zur Berechnung der Mittelwerte und der Streuung (der Einzelwerte) bearbeitet und sodann dem t-Test nach STUDENT (CAVALLI-SFORZA 1964) unterzogen. Dieser nicht-parameterfreie Test darf nur bei Vorliegen einer den Werten unterliegenden Normalverteilung verwendet werden; diese Bedingung für metrische Knochengrößen wurde inzwischen mehrfach überprüft und bestätigt (BANGEL 1976; HOFFMANN 1977; MICHELS 1976; ROETZ und MICHELS 1976; SIEGMUND 1977 u. a.) und am vorliegenden Material nicht mehr erneut überprüft. Als Signifikanzschwelle wurde $P \leq 0,01$ gewählt ($\approx 99\%$ iger Überschreitungswahrscheinlichkeit).

Um einmal festzustellen, ob durch eine sehr geringe Stichprobenauswahl eine deutliche Veränderung der Effekte abgelesen wird, wurden zunächst willkürlich 20 Feten, die aus den Würfen zusammengezogen wurden, aus den einzelnen Versuchsgruppen (Werte s. Tabellen 4 a - e) ausgemessen und Mittelwerte und Streuung berechnet. Eine gleiche Berechnung erfolgte danach aus allen Versuchstieren. Insgesamt wurden die zitierten fünf Schädelelemente ausgemessen an

K	53 Feten (8 Würfe)
C 5	49 Feten (7 Würfe)
C 6	47 Feten (8 Würfe)
A 100	51 Feten (8 Würfe)
A 150	39 Feten (6 Würfe)
C 4 + A 100	43 Feten (7 Würfe)

Insgesamt wurden 1410 Knochenelemente von 282 Feten ausgemessen und in die Berechnungen einbezogen.

Abbildung 3:

Topographie der vermessenen Skelettelemente
am Schädel der erwachsenen Ratte (aus HAGEMANN
& SCHMIDT 1960 verändert)

- a) und b) Dorsalansicht
- c) Seitenansicht

Die Mandibulae sind abgetrennt.

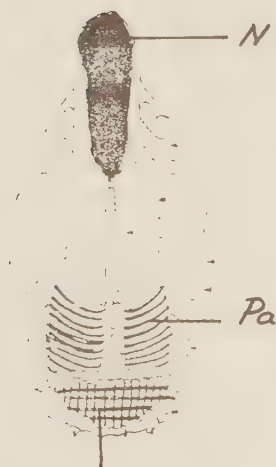
N = Nasale

Pa = Parietale

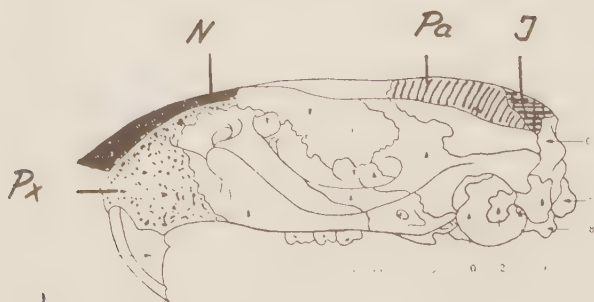
Px = Praemaxillae

I = Interparietale

a)



b)



c)

Abbildung 4:

Beispiele für die Anordnung der isolierten fetalen Schädelknochen zur Messung der Flächenprojektionen (indirekte Methode) im Quantimet 720.

- a) 100 ug Actinomycin D/kg, d 12 p.c.
- b) 5 my Cyclophosphamid/kg, d 12 p.c.
- c) 4 mg Cyclophosphamid + 100 ug Actinomycin D/kg, d 12 p.c.

M = Mandibulae

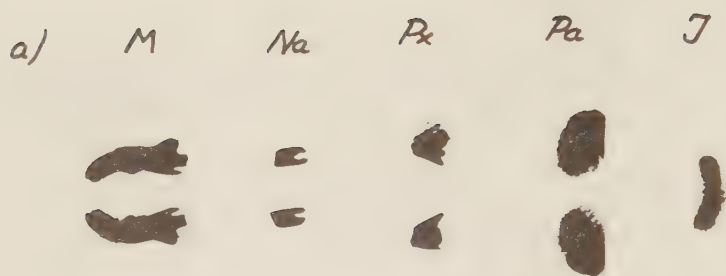
Na = Nasalia

Px = Praemaxillae

Pa = Parietalia

I = Interparietale

Abb. 4



III. ERGEBNISSE

Die Stichprobenauswahl ($n = 20$) der Meßwerte ist in den Tabellen 3 a - e wiedergegeben. Die statistischen Ergebnisse, Mittelwerte, Streuungen der Einzelwerte und prozentuale Vergleiche mit den Mittelwerten sind für die Stichproben und die Gesamtheit der Meßwerte in den Tabellen 4 a - e zusammen mit den Ergebnissen des t-Tests nach STUDENT angeführt. Die Abbildungen 5-9 geben die prozentualen Veränderungen der Knochenflächenprojektionen im Vergleich zu den Werten aus unbehandelten Kontrolltieren an.

Die Ergebnisse sind sehr einheitlich. Das gewählte Signifikanzniveau von $P \leq 0.01$ wird in den Versuchsgruppen mit einmaliger Applikation von 100 oder 150 μg Actinomycin D/kg (d 12 p.c.) in keinem Fall erreicht - diese beiden Dosierungen haben in den vorliegenden Versuchen keinen Einfluß auf die Entwicklung der ausgemessenen Schädelflächen Cyclophosphamid hat bei einmaliger Applikation von 5 bzw. 6 mg/kg (d 12 p.c.) eine deutliche Hemmwirkung auf das Knochenwachstum der Nasalia, Parietalia, Praemaxillae und Mandibulae, die maximal um ca. 25 % (Nasalia und Praemaxillae) verkleinert sind. Im Gegensatz hierzu wird das Wachstum des Os interparietale durch einmalige Applikation von 5 bzw. 6 mg Cyclophosphamid/kg (d 12 p.c.) nur um maximal 9 % reduziert - der Wert ist in dieser Untersuchung als statistisch nicht signifikant zu werten.

Interessant ist der Ausfall der Stichprobenanalyse, die in sehr guter Übereinstimmung mit den Werten aus der gesamten Untersuchung steht und in dieser Art - Mischung der Stichprobe aus den einzelnen Würfen (vgl. JENSCH et al. 1970) - durchaus das Ergebnis vorabzuschätzen gestattet.

Tabelle 3 a: Einzelwerte der Stichprobenmessung

Nasalia

n	K	C 5	C 6	A 100	A 150	C 4 + A100
1	1680	1080	980	1600	1520	930
2	1690	1170	1070	1630	1530	1040
3	1750	1170	1120	1750	1630	1120
4	1770	1240	1230	1750	1670	1150
5	1800	1260	1280	1770	1740	1230
6	1830	1380	1310	1800	1780	1340
7	1830	1390	1330	1820	1820	1340
8	1940	1450	1450	1830	1840	1380
9	1960	1480	1450	1900	1880	1420
10	1960	1500	1500	1920	1900	1430
11	2000	1500	1530	1940	1900	1480
12	2030	1570	1540	1970	1970	1480
13	2040	1570	1630	2000	1990	1500
14	2100	1630	1670	2030	2020	1530
15	2150	1690	1700	2150	2030	1670
16	2220	1700	1760	2270	2150	1670
17	2240	1810	1820	2270	2300	1700
18	2330	1820	1930	2340	2320	1910
19	2350	1980	2000	2420	2510	1940
20	2400	2000	2120	2500	2570	2150

Tabelle 3 b: Einzelwerte der Stichprobenmessung

Parietalia

1	7720	6310	5300	7030	7080	5830
2	7850	6580	5430	7280	7190	6020
3	7940	6630	5780	7540	7450	6270
4	7940	6850	5940	7680	7560	6380
5	8090	6940	6070	7850	7760	6570
6	8130	7000	6130	7940	7970	6640
7	8270	7230	6350	8020	8030	6730
8	8430	7470	6560	8250	8120	6880
9	8580	7580	6580	8370	8150	6970
10	8600	7620	6600	8400	8210	7020
11	8600	7720	6600	8420	8250	7020
12	8630	7700	6640	8480	8270	7100
13	8700	7920	6730	8670	8430	7320
13	8820	7950	6910	8670	8550	7470
15	8970	8040	7000	8750	8670	7560
16	8970	8170	7230	8840	8700	7700
17	9020	8380	7480	8880	8830	7740
18	9230	8560	7520	8900	8920	7860
19	9340	8680	7730	9030	9000	8020
20	9420	8810	8040	9220	9120	8130

Tabelle 3 c: Einzelwerte der Stichprobenmessung

Interparietale

1	2080	1720	1780	2000	1910	1400
2	2090	1840	1860	2130	1980	1450
3	2140	1950	1920	2360	2070	1560
4	2180	2070	1950	2440	2130	1730
5	2270	2130	2070	2580	2250	1800
6	2350	2250	2130	2580	2340	1960
7	2430	2380	2250	2670	2470	2050
8	2570	2460	2250	2690	2560	2170
9	2600	2470	2380	2730	2570	2290
10	2680	2500	2400	2770	2650	2300
11	2720	2500	2420	2800	2680	2320
12	2780	2620	2560	2820	2680	2370
13	2840	2670	2570	2850	2750	2410
14	2960	2730	2640	2940	2750	2530
15	2970	2770	2730	2950	2830	2550
16	3020	2840	2700	3000	2830	2670
17	3050	2840	2820	3030	2900	2670
18	3140	2930	2970	3100	2920	2700
19	3220	3070	3010	3120	3030	2810
20	3300	3100	3230	3240	3070	2930

Tabelle 3 d: Einzelwerte der Stichprobenmessung

Mandibulae

1	7680	6350	6130	7490	7290	6040
2	7740	6430	6310	7530	7430	6150
3	7820	6490	6550	7660	7550	6210
4	7860	6530	6780	7820	7680	6370
5	7900	6620	6840	7850	7700	6590
6	7970	6840	6870	7940	7930	6640
7	8000	6980	6930	8090	8020	6830
8	8180	7030	7090	8170	8060	6920
9	8240	7190	7140	8150	8180	7000
10	8280	7240	7180	8240	8290	7080
11	8320	7300	7220	8300	8350	7140
12	8340	7320	7280	8390	8340	7170
13	8400	7370	7350	8410	8400	7200
14	8420	7420	7430	8540	8420	7330
15	8530	7440	7550	8660	8570	7440
16	8600	7550	7680	8730	8780	7550
17	8710	7670	7830	8870	8780	7720
18	8840	7720	8010	9050	8800	7940
19	8920	7950	8140	9140	8940	8030
20	9070	8000	8210	9200	9120	8110

Tabelle 3 e: Einzelwerte der Stichprobenmessung

Praemaxillae

1	2080	1780	1600	2010	1920	1500
2	2170	1790	1610	2050	1970	1520
3	2250	1840	1700	2130	2030	1670
4	2300	1840	1840	2170	2080	1740
5	2360	1900	1870	2240	2220	1780
6	2420	1930	1920	2320	2240	1870
7	2480	2060	1990	2380	2260	1870
8	2590	2060	2000	2470	2370	1920
9	2590	2090	2040	2480	2370	1980
10	2620	2100	2100	2520	2430	2000
11	2650	2100	2100	2540	2480	2000
12	2650	2180	2160	2570	2480	2040
13	2660	2230	2200	2540	2500	2100
14	2730	2260	2220	2630	2510	2120
15	2760	2370	2370	2720	2620	2250
16	2770	2370	2440	2750	2620	2260
17	2830	2450	2490	2830	2750	2340
18	2840	2540	2530	2940	2830	2330
19	2910	2600	2550	3020	2920	2400
20	3000	2620	2670	3190	3070	2570

Tabelle 4 a: Statistische Ergebnisse der Messungen

Nasalia

Versuchsgruppe (Vg)	K	C5	C6	A 100	A 150	C4+A100
n	20	20	20	20	20	20
M (BP)	2003,5	1594,5	1520,0	1983,0	1955,5	1470,5
± s	223,7	273,6	312,9	261,8	296,0	309,5
M (%)	100,0	79,6	75,9	99,0	97,5	73,4
± s	11,2	17,1	20,6	13,2	15,1	21,0
N	53	49	47	51	39	43
M (BP)	1983,5	1611,5	1506,3	1963,2	1884,3	1481,0
± s	299,4	292,3	314,1	288,2	324,2	306,3
M (mm ²)	2,81	2,28	2,13	2,78	2,67	2,10
± s	0,42	0,41	0,45	0,41	0,46	0,43
M (%)	100,0	81,2	75,9	99,0	95,0	74,7
± s	15,1	18,1	20,9	14,7	17,2	20,7
t (K/Vg)	-	6,4	7,8	0,4	1,5	8,1
P	-	0,01	0,01	n.sign.	n.sign.	0,01

Tabelle 4 b:

Statistische Ergebnisse der Messungen

Parietalia

Versuchsgruppe (Vg)		K		C5		C6		A 100		A 150		C4+A100	
n		20	53	49	47	51	39	43		20	20	20	
M (BP)		8562,5	7607,0	6631,0	8311,6	8213,3	7061,5						
+ s		+509,2	+728,6	+738,3	+604,0	+588,7	+661,6						
M (%)		100,0	88,8	77,4	97,1	95,9	82,5						
+ s		+ 5,9	+ 9,6	+ 11,1	+ 7,3	+ 7,2	+ 9,4						
N		53	49	47	51	39	43						
M (BP)		8211,3	7502,1	6811,7	8270,4	8103,2	7004,8						
+ s		+674,1	+799,3	+732,4	+714,1	+648,5	+692,1						
M (mm ²)		11,64	10,63	9,65	11,72	11,48	9,93						
+ s		0,96	1,13	1,04	1,01	0,92	0,98						
M (%)		100,0	91,4	83,0	100,7	98,7	85,3						
+ s		+ 8,2	+ 10,7	+ 10,8	+ 8,6	+ 8,0	+ 9,9						
t (K/Vg)		-	4,9	9,9	0,4	0,8	8,6						
p		-	0,01	0,01	n.sign.	n.sign.	0,01						

Tabelle 4 c: Statistische Ergebnisse der Messungen

Interparietale

Versuchsgruppe (Vg)	K	C5	C6	A 100	A 150	C4+A100
n	20	20	20	20	20	20
M (BP)	2669,5	24,92,1	2432,3	2740,7	2568,5	2233,5
+ s	393,7	398,5	409,7	324,1	349,2	458,0
-	100,0	93,4	91,1	102,6	96,2	83,7
M (%)	14,7	16,0	16,8	11,8	13,6	20,5
+ s						
-						
N	53	49	47	51	39	43
M (BP)	2512,1	2482,7	2289,7	2611,3	2508,2	2089,0
+ s	423,5	378,3	512,2	354,3	371,3	480,4
-	3,56	3,52	3,25	3,71	3,55	2,96
M (mm ²)						
+ s	0,60	0,54	0,73	0,50	0,53	0,68
-	100,0	98,8	91,1	103,9	99,9	83,2
M (%)	16,9	15,2	22,4	13,6	14,8	23,0
+ s						
-						
t (K/Vg)	-	0,4	2,3	1,4	0,08	4,6
p	-	n.sign.	0,05	n.sign.	n.sign.	0,01

Tabelle 4 d: Statistische Ergebnisse der Messungen

Mandibulae

Versuchsgruppe (Vg)	K	C5	C6	A 100	A 150	C4+A100
n	20	20	20	20	20	20
M (BP)	8291,0	7172,3	7226,1	8311,5	8231,6	7073,2
± s	404,2	501,2	573,2	518,1	521,7	619,3
M (%)	100,0	86,6	87,2	100,2	99,3	85,3
± s	4,9	6,9	7,9	6,2	6,3	8,8
N	53	49	47	51	39	43
M (BP)	8439,7	7208,5	7259,8	8451,6	8201,0	7151,2
± s	455,3	521,2	633,1	539,9	587,7	773,4
M (mm ²)	11,96	10,22	10,29	11,98	11,62	10,13
± s	0,65	0,74	0,90	0,77	0,83	1,10
M (%)	100,0	85,4	86,0	100,1	97,2	84,7
± s	5,4	7,2	8,7	6,4	7,2	10,8
t (K/Vg)	-	12,6	10,7	0,14	2,2	10,1
P	-	0,01	0,01	n.sign.	0,05	0,01

Tabelle 4 e: Statistische Ergebnisse der Messungen

Praemaxillae

Versuchsgruppe (Vg)	K	C5		C6		A 100		A 150		C4+A100	
		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
n											
M (BP)		2583,1	2155,5	2120,0	2525,7	2433,5	2013,2				
+ s		252,7	269,1	316,4	322,6	313,8	290,9				
M (%)		100,0	83,4	82,1	97,8	94,2	77,9				
+ s		9,8	8,4	14,9	12,8	12,9	14,5				
N		53	49	47	51	39	43				
M (BP)		2612,3	2223,7	2027,4	2573,4	2501,6	2001,8				
+ s		302,2	291,4	353,9	362,5	367,4	312,2				
M (mm ²)		3,70	3,15	2,87	3,65	3,55	2,84				
+ s		0,43	0,41	0,50	0,51	0,52	0,44				
M (%)		100,0	85,1	77,7	98,5	95,8	76,6				
+ s		11,6	13,1	17,5	14,1	14,7	15,6				
t (K/Vg)	-		6,6	8,9	0,05	1,5	9,6				
p	-		0,01	0,01	n.sign.	n.sign.	0,01				

Abbildungen 5-9

Effekte der einmaligen Applikation von Cyclophosphamid
Actinomycin D bzw. von Cyclophosphamid und Actinomycin D
am Tag 12 p.c. auf Schädelknochen von Wistarratten

Abb. 5: Nasalia

Abb. 6: Parietalia

Abb. 7: Os interparietale

Abb. 8: Mandibulae

Abb. 9: Praemaxillae

Prozentualer Mittelwertsvergleich (± Streuung der Einzelwerte in % der Mittelwerte)

- K: Kontrolle = 100 %
A: 100 ug Actinomycin D/kg
B: 150 ug Actinomycin D/kg
C: 5 mg Cyclophosphamid/kg
D: 6 mg Cyclophosphamid/kg
E: 4 mg Cyclophosphamid + 100 ug Actinomycin D/kg

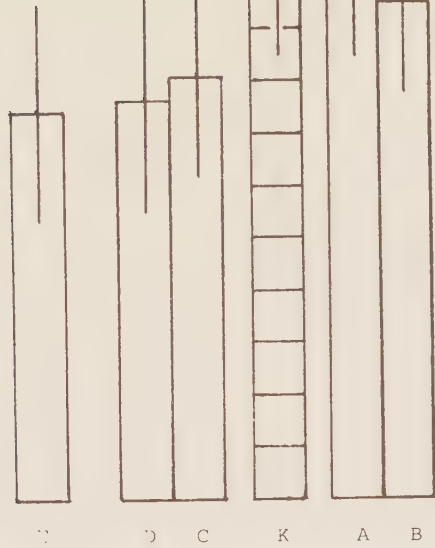


Abb. 5



Abb. 6

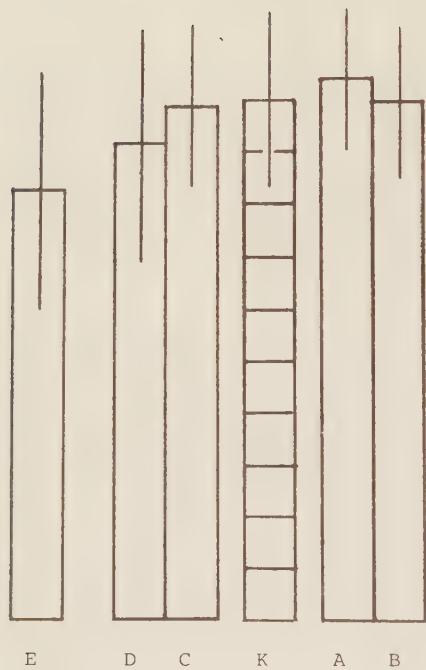


Abb. 7



Abb. 8



Abb. 9

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Angaben in der Literatur zur Interpretation der mit Quantimet 720 erhaltenen Befunde fehlen vollständig, auch werden morphometrische Daten - wenn überhaupt gewonnen - kaum publiziert. Aus der (s. Einleitung) reichlichen teratologischen Literatur über Cyclophosphamid und Actinomycin D kann nur abgeleitet werden, daß beide cytostatisch aktiven Substanzen offenbar auf verschiedene Art und Weise mit dem Apparat der genetischen Information interferieren und Prozesse der embryonalen Differenzierung nachhaltig zu stören vermögen.

Die einzigen direkt beziehbaren Daten entstammen Dissertationen aus dem Bereich des berliner SFB 29 "Embryonalpharmakologie". KLOPPENBURG (1972) hat zuerst Versuche mit Kombinationen von Cyclophosphamid und Actinomycin D an trächtigen Wistaratten durchgeführt, beschränkt sich dabei jedoch auf eine Beschreibung der nur geringfügigen Variationen. Danach sind einmalige Gaben von 4 und 5 mg Cyclophosphamid/kg sowie von 100 µg Actinomycin D oder der Kombination von 4 mg Cyclophosphamid mit 100 µg Actinomycin D/kg (d 12 p.c.) ohne signifikanten Einfluß auf die Fetalgewichte und auf das Vorkommen von Skelettanomalitäten, speziell nicht beim Interparietale oder den Parietalia. Mit 6 mg Cyclophosphamid/kg werden dann schon deutlichere Veränderungen der Skelettentwicklung mit dem allgemeinen intrauterinen Wachstum registriert. Die von KLOPPENBURG statistisch herausgearbeiteten Vorstellungen müssen mit einiger Vorsicht bewertet werden, da die knöchernen Veränderungen nur subjektiv erkannt werden und die tatsächlichen Meßwertdifferenzen nur relativ geringfügig sind. Quantitativ ähnlich geringe Differenzen findet SIEGERT (1976), der mittels Meßokular die Längen langer

Röhrenknochen sowie Länge und Breite des Os interparietale ausmißt und zusätzlich die Ossifikationspunkte in anderen Skelettabschnitten auszählt. SIEGERT hat diese Ergebnisse in instruktiven Diagrammen zusammengestellt. Aus diesen folgt, daß nennenswerte Wachstumsreduktionen am gesamten fetalen Skelett erst nach 6 mg Cyclophosphamid/kg am 12. intrauterinen Entwicklungstag auftreten, wogegen außer der Zahl der ossifizierten caudalen Wirbelkörper andere Skelettabschnitte mit den in dieser Arbeit verwendeten Dosierungen von Actinomycin D und Cyclophosphamid nicht auftreten. Die z. T. sehr geringen Tierzahlen bei SIEGERT machen zudem eine gewichtigere Abschätzung der sonst nur $\pm 3\%$ betragenden Abweichungen von den unbehandelten Kontrollen unmöglich, obgleich in den Diagrammen in ihrer Gesamtheit zweifellos gewisse Reaktionstrends hervortreten.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten erlauben im Gegensatz zu den vorstehend zitierten Ergebnissen von KLOPPENBURG und SIEGERT deutliche Aussagen. An allen fünf Elementen des knöchernen Schädel skeletts nehmen mit steigender Cyclophosphamiddosis die Flächenreduktionen zu; sie erreichen nur für das Interparietale nicht die vorgegebene Signifikanzschwelle. Weder mit 100 noch mit 150 ug Actinomycin D/kg werden signifikante Veränderungen der flächigen Knochenbildung an den untersuchten Elementen berechnet. Die Kombination von Actinomycin D (100 ug/kg) mit Cyclophosphamid (4 mg/kg) in sicher subteratogenen und subembryotoxischen Dosierungen ergibt jedoch Flächenreduktionen, die für alle untersuchten Schädelknochen im Bereich der Wirkung von 6 mg Cyclophosphamid/kg liegen. Diesen Kombinationseffekt kann man nur als (gegenseitige ?) Potenzierung beider Cytostatika beschreiben. Die Frage auf welchen Mechanismen diese Potenzierung beruht, kann weder auf Grund der Kenntnisse

der unterschiedlichen pharmakologischen Angriffspunkte beider Substanzen noch anhand der vorliegenden Zahlen beantwortet werden. Sowohl die Einzelschritte der desmalen und chondralen Osteogenese wie die vielfältigen Effekte von Cyclophosphamid und Actinomycin D am genetischen Apparat der Zellen sind komplexer Natur und bis heute ist für kein einziges Teratogen der genaue Wirkungsmechanismus bekannt (v. KREYBIG 1975).

SIEGMUND (1977) hat mit gleicher vollelektronischer Flächenmessung an den gleichen Knochenelementen allerdings mit Cyclophosphamid und Azathioprin und Kombination beider Substanzen im Gegensatz zu den vorliegenden Meßwerten ein differentiellies Reaktionsmuster der einzelnen Knochen gefunden. Die Zahlenwerte für 6 mg Cyclophosphamid/kg sind direkt vergleichbar und auch hier ist das Os interparietale am geringsten betroffen. Die Wirkungsmechanismen von Azathioprin, einem Antimetaboliten, und Actinomycin D sind allerdings derart verschieden, daß keine weiteren Vergleiche möglich sind.

Eine sorgfältige teratologische Wirkungsanalyse sollte in Zukunft stets neben der Inspektion und einfachen Morphometrie Flächenmessungen ausgewählter Knochenelemente umfassen, die bei relativ geringem Umfang der Versuchsserien, wobei Schätzungen schon bei ca. 20 Feten möglich sind, exakte Zahlen liefern und Wirkungen von Pharmaka sowie deren Kombinationen wissenschaftlich zugänglich machen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die bislang bekannten Effekte der cytostatischen Substanzen Cyclophosphamid und Actinomycin D werden anhand der Literatur besprochen und im Zusammenhang mit ihren teratogenen Wirkungen diskutiert.
2. Trächtige Wistarratten erhalten einmal s.c. 100 bzw. 150 ug Actinomycin D/kg oder i.p. 5 bzw. 6 mg Cyclophosphamid/kg oder in einer weiteren Versuchsgruppe simultan 100 ug Actinomycin D + 4 mg Cyclophosphamid/kg am 12. intrauterinen Entwicklungstag appliziert.
3. Am 21. Entwicklungstag werden die Feten per sectionem präpariert und zur Skelettdarstellung aufgeheilt und mit Alizarinrot S angefärbt. Aus den Schädelknochen der Präparate werden das Os interparietale und die paarigen Nasalia, Praemaxillae, Parietalia und Mandibulae freipräpariert, 10fach photographisch vergrößert und im System Quantimet 720 die Flächenprojektionen gemessen. Insgesamt werden 1410 Schädelemente von 282 Feten ausgemessen.
4. Actinomycin D ist in den verwendeten Dosierungen ohne Effekt auf das Flächenwachstum der untersuchten Schädelemente.
5. In klarer Dosisabhängigkeit wird mit Cyclophosphamid das Flächenwachstum der Nasalia, Parietalia, Praemaxillae und Mandibulae signifikant ($p < 0,01$) und maximal bis zu 25 % gehemmt, während das Wachstum des Os interparietale hinsichtlich der gewählten Signifikanzschwelle unbeeinflusst bleibt.
6. Durch Kombination der ateratogenen Dosierungen 4 mg Cyclophosphamid/kg + 100 ug Actinomycin D/kg (d 12 p.c.) wird bei allen untersuchten Skelettelementen das Flächenwachstum signifikant ($P < 0,01$) reduziert.

7. Die unterschiedlichen Wirkungen der Substanzen sowie das unterschiedliche Ansprechen der einzelnen Skelettelemente auf die Behandlungen wird diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- ALARCON, R. A., MEIENHOFER, J. (1971)
Formation of the cytolytic aldehyde
acrolein during in vitro
degradation of cyclophosphamide.
Nature Neu Biol. 233, 50-52.
- ASISI, A. (1976)
Morphometrische Analyse der Wirkungen von
Cyclophosphamid und Azathioprin auf die
intrauterine Skelettentwicklung im bei
Wistar-Ratten.
Med. Dissertation Freie Universität Berlin
- BINS, J. S., GIBSON, J. E. (1973)
Teratogenicity and neonatal toxicity of
ifosfamide in mice.
Proc. Soc. exper. Biol. Med. 143, 965-70
- BRACHET, J., H. DENIS, E. DE VITRY (1964)
The effects of actinomycin D and puromycin
on morphogenesis in amphibian eggs
and Acetabularia mediterranea.
Dev. Biol. 9, 398-434
- CARPENT, G., L. DESCLIN (1967)
A propos du mecanisme d'action de l'actinomycine
D sur la gestation chez le rat
C. R. Acad. Sci. Paris D 264, 2933-36
- CAVALLI-SFORZA, L. (1964):
Grundbegriffe der Biometrie, insbesondere
der statistischen Methoden bei der Wert-
bemessung biologisch wirksamer Substanzen
G. Fischer, Stuttgart
- CHAUBE, S., KURY, G., MURPHY, M. L. (1967)
Teratogenic effects of cyclophosphamide (NSC-
26271) in the rat.
Canc. Chemother. Rep. 51, 363-76

CONKLIN, K. A., CHOU, S. C., RAMANATHAN, S. HEV, P.

(1970)

Actinomycin D.: effect on macromolecular synthesis in synchronized *Tetrahymena pyri-formis*.

Pharmacology 4, 91-101

CRATHORN, A. R., ROBERTS, J. J. (1966)

Mechanism of the cytotoxic action of alkylating agents in mammalian cells and evidence for the removal of alkylated groups from deoxyribonucleic acid.

Nature 211, 150-53

DRINGS, P., ALLNER, R., BROCK, N., BURKERT, H., FISCHER, M., FÖLSCH, E., GERHARTZ, H., GÖTZKY, P., HOPPE, I., KANZLER, G., KLEIN, H. O., MAINZER, K., MARTIN, H., OBRECHT, P., PALME, G., PAULISCH, H., RIEEG, H., SCHUBERT, J. C. F., TRESKE, U., WEISE, W., WILLEMS, D., WILMANN, H., WITTE, S., WOLDENBERG, H. (1970):

Erfahrungen mit neuartigen N-Lost-Phosphamidestern

Dtsch. med. Wschr. 95, 491-97

DRUCKEREY, H., STEINHOFF, D., NAKAYAMA, M., PREUSS-MANN, R., ANGER, K. (1963)

Experimentelle Beiträge zum Dosis-Problem in der Krebs-Chemotherapie und zur Wirkungsweise von Endoxan.

Dtsch. med. Wschr. 88, 651-63, 715-21

ELIS, J., J. A. DI PAOLO (1970)

The alteration of actinomycin D teratogenesis by hormones and nucleic acids

Teratology 3, 33-38

ENGELS, K. (1970)

Biochemical studies on the embryotoxic actions of cyclophosphamide.

In: BASS-BECK-MERKER-NEUBERT-RANDHAHN

(eds.): Metabolic pathways in mammalian embryos during organogenesis and its modification by drugs.

Freie Univ. Berlin, pp. 123-36

ENGELS, K., KROWKE, R., NEUBERT, D. (1968)

Vergleichende Untersuchungen über die Alkylierung von embryonalem und mütterlichem Gewebe durch Cyclophosphamid

Naunyn-Schmiedeberg & Arch. exp. Path. 260, 110

FRITZ, H., HESS, R. (1971)

Effect of cyclophosphamide on embryonic development in the rabbit

Agents and actions (Basel) 2, 83-86

GEBHARDT, D. O. E. (1970)

The embryo-lethal and teratogenic effects of cyclophosphamide on mouse embryos.

Teratology 3, 273-78

GERLINGER, P. (1964)

Action du cyclophosphamide injecté à la mère sur réalisation de la forme du corps des embryons du lapin.

C R Soc. Biol. 158, 2154-57

GERLINGER, P., RUCH, J. V., CLAVERT, J. (1963)

Action du cyclophosphamide sur la formation de l'embryon

C R Soc. Biol. 157, 173-76

GIBSON, J. E., BECKER, B. A. (1968 a)

The teratogenicity of cyclophosphamide in mice. Cancer Res. 28, 475-80

- GIBSON, J. E., BECKER, B. A. (1968 b)
Effect of phenobarbital and SKF 525-A on
the teratogenicity of cyclophosphamide
in mice.
Teratology 1, 393-98
- GIBSON, J. E., BECKER, B. A. (1971)
Effect of phenobarbital and SKF 625 A on
placental transfer of cyclophosphamide in
mice
J. Pharmacol. exp. Ther. 171, 256-62
- GIBSON, J. E., SHORT, R. D. (1971)
Effects of cyclophosphamide on prenatal
protein and nucleic acid biosynthesis
Pharmacologist 13, 467
- GOLBOS, M. S., CALARCO, P. G., EPSTEIN, C. J. (1973)
The effects of inhibitors of RNA synthesis
(L. amanitin and actinomycin D) on
preimplantation mouse embryos
J. exptl. Zool. 186, 207-16
- GOLDBERG, I. M., REICH, E. (1964)
Actinomycin inhibition of RNA snythesis
directed by DNA
Fed. Proc. 23, 958-64
- GOTTSCHESKI, G. H. M., ZIMMERMANN, W. (1963)
Auslösung von Blastopathien beim Säugetier
durch Cyclophosphamid und Thalidomid
Naturwissenschaften 50, 525
- GREENBERG, L. H., VERDES, P., TANAKA, K. R. (1964)
Congenital anomalies probably induced by
cyclophosphamide.
J. Amer. Med. Assoc. 188, 423-26
- HACKENBERGER, I., von KREYBIG, T. (1965)
Vergleichende teratologische Untersuchungen
bei der Maus und bei der Ratte
Arzneimittel-Forsch. 15, 1456-60

- AGEMANN, E., SCHMIDT, G. (1960)
Ratte und Maus, Versuchstiere in der Forschung,
De Gruyter, Berlin
- HAMANN, W., OEHLERT, W., HEDDERICH, M. (1968)
Inkorporation und Eliminierung von Actinomycin D ^3H durch verschiedene Zellarten in vitro
Virchows Arch. Abt. B Zellpathol. 1, 120-30
- HARRIS, H. (1964)
Breakdown of nuclear ribonucleic acid in the
presence of actinomycin D
Nature 202, 1303-03
- HEINECKE, H., KLAUS, S. (1973)
Zur Problematik der Prüfung von Teratogenen
Acta Univ. Carolinae Med. Monogr. LVI/LVII,
93-96
- JENSH, R. P., BRENT, R. L. (1966)
Rapid schedules for KOH clearing and alizarin
red S staining for fetal rat bone.
Stain Technol. 41, 179-183
- JENSH, R. P., P. L. BRENT, M. BARR jr. (1970):
The litter effect as a variable in teratologic
studies of the albino rat.
Amer. J. Anat. 128, 185-192
- JORDAN, R. L., J. G. WILSON (1970)
Radioautographic study of RNA synthesis in
normal and actinomycin D-treated rat embryos
Anat. Rec. 168, 549-64
- v. KEUTEL, A. (1975):
Morphometrische Analyse der fetalen Rippen-
und Beckenknochen bei Rattenfeten nach Ein-
wirkung von Azathioprin und Cyclophosphamid
Med. Dissertation, Freie Universität Berlin

- KLEIN, H. O., LENNARTZ, K. J., GROSS, R., EDER, M., FISCHER, R. (1972)
In-vivo- und in-vitro-Untersuchungen zur Zellkinetik und Synchronisation menschlicher Tumorzellen. Ihre Bedeutung für die zytostatische Tumorthherapie.
Dtsch. med. Wschr. 97, 1273-82
- KLEIN, N. W., PIERRO, R. J. (1963)
Actinomycin D: specific inhibitory effects on the explanted chick embryo
Science 142, 967-69
- KLOPPENBURG, W. (1972)
Wirkungen einer Kombination von Cyclophosphamid und Actinomycin D auf Rattenembryonen
Med. Dissertation, Freie Universität Berlin
- KNÖRR, K., H. KNÖRR-GORTHNER und B. ÜBELE-KALLHARDT (1969)
Zur Frage der Wirkung alkylierender Substanzen auf die Entwicklung der Frucht
- KOCHS, W. (1972)
Embryotoxische Wirkung von Cyclophosphamid in Kombination mit Azathiopsin
Med. Dissertation, Freie Universität Berlin
- KÖHLER, E., MERKER, H.-J. (1972)
Studies on the teratogenic phase specificity of actinomycin D in the rat
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 225, 31-44
- KÖHLER, E., MERKER, H.-J. (1973)
Effects of cyclophosphamide pretreatment of pregnant animals on the activity of nuclear DNA-dependent RNA-polymerases in different parts of rat embryos.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277, 77-88.

von KREYBIG, T. (1965)

Die teratogene Wirkung von Cyclophosphamid
während der embryonalen Entwicklungsphase bei
der Ratte

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. 252,
173-95

v. KREYBIG, T. (1975):

Entstehung von Mißbildungen aus inneren und
äußeren Ursachen

Urban & Schwarzenberg, München - Berlin - Wien

von KREYBIG, T., SCHMIDT, W. (1967):

Chemisch induzierte Fetopathien bei der Ratte
Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung
von Cyclophosphamid und N.-Methyl-N-nitroso-
Harnstoff nach der Gabe am 15. und 16. Tag der
Gestation

Arzneimittel-Forsch. 17, 1093-1100

LORCH, I. J., JEON, K. W. (1969)

Reversible effect of actinomycin D on nucleoli
of *Amoeba discoides*: Nuclear transplantation
study

Nature 221, 1073-74

MERKER, H.-J. (1970)

Morphological and autoradiographical studies
on the teratogenic effect of cyclophosphamide.

In: BASS-BECK-MERKER-NEUBERT-RANDMANN (eds.):
Metabolic pathways in mammalian embryos during
organogenesis and its modification by drugs
Freie Univ. Berlin, pp. 141-149

MERKER, H.-J., PALME, G., LISS, E. (1966)

Membranstrukturen in den Kernen von EHRLICH -
Ascitistumorzellen nach Einwirkung von Cyclo-
phosphamid (Endoxan)

Naturwissenschaften 53, 229-30

MERKER, H.-J., KÖHLER, E., NEUBERT, T., SPORS, S. (1968)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über
den Einfluß von Cyclophosphamid auf die

Hirnentwicklung der Ratte
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. exp. Path.
269, 176

MICHELS, G. (1976)

Versuche zu einer quantitativen Charakterisierung der teratogenen Effekte von 5 Brom-2'-desoxyuridin an der fetalen Extremität von NMRI-Mäusen

Veterinärmedizinische Dissertation, FU Berlin

MUPRHY, M. L. (1959)

A comparison of the teratogenic effects of five polyfunctional alkylating agents on the rat fetus.

Pediatrics 23, 231-44

NEUBERT, D. (1968)

Beeinflussung des Nucleinsäure- und Protein-stoffwechsels durch Pharmaka

Internist 7, 435-54

NEUBERT, D., H.-J. MERKER, E. KÖHLER, R. KROWKE und H.-J. BARRACH (1970)

Biochemical aspects of teratology.

Adr. Biosciences 6, 595-622

PASTAN, I., FRIEDMAN, R. M. (1968)

Actinomycin D: inhibition of phospholipid synthesis in chick embryo alls.

Science 160, 316-17

PIERRO, L. J. (1961 a)

Teratogenic action of actinomycin D in the embryonic chick.

J. exptl. Zool. 147, 203-10

PIERRO, L. J. (1961 b)

Teratogenic action of actinomycin D on the embryonic chick II. Early development

J. exptl. Zool. 148, 241-50

POZHIDAYEV, E. A. (1969)

Some characteristics of embryogenesis following administration of actinomycin D and leavomycetin (chlorumphericol) to female rats before and after semination

Arch. Anat. Hist. Embriol. 61: 5, 39-50

ROETZ, R., MICHELS, G. (1976)

Quantitative Aspekte der teratogenen Wirkung von 5 Brom-2'desoxyuridin (BUdR) an der fetalen Mäuseextremität

71. Versamml. Anat. Ges., Rostock-Warnemünde, April 1976 - Anatom Anzeiger (im Druck)

SARMA, D. S. R., REID, I. M., SIDRANSKY, R. (1969)

The selective effect of actinomycin D on free polyribosomes of mouse liver.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 582-88

SCHLUEDERBERG, A., HENDEL, R. C., CHAVANICH, S. (1971)

Actinomycin D.: Renewal RNA synthesis after removal from mammalian cells

Science 172, 578-79

SCHMID, E., BRAUCHINGER, M. (1968)

Chromosomenaberrationen in menschlichen peripheren Lymphozyten nach Endoxan-Stoßtherapie gynäkologischer Tumoren

Dtsch. med. Wschr. 93, 1149-51

SCHMIDT, W. (1967)

Mikroskopische Untersuchungen an experimentell erzeugten Mißbildungen der Ratte.

Anat. Anzeiger 120, Erg.-Bd., 9-13

SCHUMACHER, B., NOACK, W. (1977)

Quantitative Methoden in der Morphologie (in Vorbereitung)

SHUJI, R., OHZU, E. (1965)

Effect of endoxan on developing mouse embryos

J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Sci. VI 15, 662-65

- SHORT, R. D., GIBSON, J. E. (1974)
C-Cyclophosphamide alkylations of mouse embryo
macromolecules
Proc. Soc. exper. Biol. Med. 145, 620-24
- SIEGERT, H. Ch. (1976)
Morphometrische Analyse der Wirkungen einer
einmaligen Applikation von Actinomycin D und/
oder Cyclophosphamid am 12. Entwicklungstag
auf die intrauterine Entwicklung des Skeletts
von Wistanratten
Med. Dissertation, Freie Universität Berlin
- SIEGMUND, H. (1977)
Morphomtrische Analyse mittels Quantimet 720
der Dosis-Wirkungsbeziehungen von Cyclophospha-
mid und Azathioprin an der intrauterinen Entwick-
lung des Schädel skeletts von Wistarratten
Zahnmed. Dissertation, FU Berlin
- SINGH, S. (1971)
The teratogenicity of cyclophosphamide (Endox-
an-Asta) in rats
Indian J. Med. Res. 59, 1128-35
- SINGH, S., GUPTA, P. K. (1972)
Lethality and teratogenicity of cyclophospha-
mid (Endoxan-Asta) in chick embryos
Congenital Abnormalities 12, 61-72
- SINGH, S., SANYAL, A. K. (1972)
Effect of cyclophosphamide (Endoxan-Asta) on
the developing rat embryos
J. Anat. Soc. India 21, 10-20
- SINGH, S., SANYAL, A. K. (1973)
Abnormal patterns of ossification in the trends
of fetuses produced by cyclophosphamide ad-
ministration ot pregnant rats
Proc. J. Anat. Soc. India 22, 49

SINGH, S., SANYAL, A. K. (1974 a)

Skeletal malformations of forele of
rat fetuses caused by maternal administration
of cyclophosphamide during pregnancy
J. Anat. 117, 179-89

SING, S., SANYAL, A. K. (1974 b)

Abnormal patterns of ossification in the hands
of foetuses produced by cyclophosphamide admi-
nistration to pregnant rats
Acta anat. 89, 121-33

SINGH, S., SANYAL, A. K., SINGH, S. P. (1971 a)

Digital anomalies induced by cyclophosphamide
(Endoxan-Asta) in rat foetuses
Acta orthop. Scand. 45, 21-35

SINGH, S., TULI, S. M., GUPTA, P. K. (1971 b)

Skeletal defects induced by cyclophosphamide
(Endoxan Asta) in chick embryos Preliminary
report
Acta orthop. Scand. 42, 217-26

SINGH, S., SANYAL, A. K., KAR, A. K. (1974)

The effect of cyclophosphamide on the morpho-
genesis of the cerebellum in chick embryos
Anat. Res. 178, 127-38

SKALKO, R. G., MORSE, J. M. D. (1969)

The differential response of the early mouse
embryo to actinomycin D treatment in vitro
Teratology 247-54

STERN, R., FRIEDMAN, R. M. (1970)

Double-stranded RNA synthesized in animal cells
in the presence of actinomycin D
Nature 226, 612-16

TASKA, R. J., HILLMAN, N. (1970)

Effects of actinomycin D and cycloheximide
on RNA and protein synthesis in cleavage
stage mouse embryos
Nature 225, 1022-25

TIEDEMANN, H., BORN, J., TIEDEMANN, H. (1967)

Embryonale Induktion und Hemmungen der Ribonukleinsäure-Synthese durch Actinomycin D
Z. Naturforsch. 221, 649-59

TOLEDO, T. M., HARPER, R. C., MOSER, R. H. (1971)

Fetal effects during cyclophosphamide and irradiation therapy
Ann int. Med. 74, 87-91

TUCHMANN-DUPLESSIS, H., MERCIER-PAROT, L. (1958)

Sur l'activisté teratogene chez le rat de l'actinomycine D
C R Acad. Sci. (Paris) 247, 200

TUCHMANN-DUPLESSIS, H., MERCIER-PAROT, L. (1959)

Production de diverses malformations par administration d'actinomycine D à la ratte gestante
C.R. Soc. biol. (Paris) 153, 386-91

TUCHMANN-DUPLESSIS, H., MERCIER-PAROT, L. (1959 b)

A propos de l'action teratogene de l'actinomycine D
C.R. Soc. biol. (Paris) 153, 1697-1700

TUCHMANN-DUPLESSIS, H., MERCIER-PAROT, L. (1960)

The teratogene action of the antibiotic actinomycin D
CIBA Found Symp. on Congenital Malformation
London, pp. 115

TUCHMANN-DUPLESSIS, H., MERCIER-PAROT, L. (1960)

A propos de l'action teratogene de l'actinomycine D, essais de prevention par l'acide pantothenique
Rev. franc. Etud. clin. biol. 5, 823

VOELCKER, G., DRÄGER, U., PETER, G., HOHORST, H. J. (1974)

Studien zum Spontanzerfall von 4-Hydroxycyclophosphamid und 4-Hydroperoxy-cyclophosphamid mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie
Arzneimittel-Forsch. 24, 1172-76

WHEELER, G. P., ALEXANDER, J. A. (1969)

Effects of nitrogen mustard and cyclophosphamide upon the synthesis of DNA in vivo and in cell free preparations
Cancer. Res. 29, 98-109

WILSON, J. G. (1966)

Effects of acute und chronic treatment with actinomycin D on pregnancy and the fetus of the rat
Harper Hosp. Bull. 24, 109

WOLKOWSKI, R. M. (1970)

Effect of actinomycin D on early axial development in chick embryos.
Teratology 3, 389-98

Lebenslauf

Name: Erbse, Dieter
Geburtsdatum: 14. Juni 1948
Geburtsort: Berlin
Wohnort: 1000 Berlin 37, Riemeisterstraße 27
Eltern: Dr. Hans Erbse (Zahnarzt),
Anne-Marie Erbse, geb. Schramm

Ausbildung: Einschulung 1954, Umschulung auf
das Paulsengymnasium 1960, Abitur 1969
auf dem Mathematisch-Naturwissenschaft-
lichen Zweig.
1969 Immatrikulation an der FU Berlin,
1970 naturwissenschaftliche Vorprüfung,
1971 zahnärztliche Vorprüfung,
1974 Approbation

Berufserfahrung:

Seit August 1974 war ich in der Praxis
meines Vaters als Assistent tätig, habe
nach dem Tode meines Vaters, im Januar
1975, die Praxis für ein halbes Jahr
selbständig weitergeführt, ab Juli 1975
war ich Vertreter des Kollegen Hans
Eberhardt in der gleichen Praxis.
Zum 1. Okt. 1976 wurde mir die Kassen-
zulassung erteilt.

Ich habe bisher keinen Promotionsversuch
an der FU Berlin oder einer anderen
Universität unternommen.

